

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FAELI LUGO NUNES

EFEITO DO GRAU HIERÁRQUICO DE DOMINÂNCIA NA MEMÓRIA DE
LAMBARIS (*Astyanax altiparanae*)



CURITIBA

2014

FAELI LUGO NUNES

EFEITO DO GRAU HIERÁRQUICO DE DOMINÂNCIA NA MEMÓRIA DE
LAMBARIS (*Astyanax altiparanae*)

Dissertação apresentada ao Curso de Pós- Graduação em Fisiologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Fisiologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marisa Fernandes de Castilho

CURITIBA

2014

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Nunes, Faeli Lugo

Efeito do grau hierárquico de dominância na memória de lambaris
(*Astyanax altiparanae*) / Faeli Lugo Nunes. – Curitiba, 2014.
36 f.: il. ; 30cm.

Orientador: Marisa Fernandes de Castilho

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia.

1. Lambari (Peixe) 2. Memória 3. I. Título II. Castilho, Marisa
Fernandes de III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências
Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia.

CDD (20. ed.) 597
591.1



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia



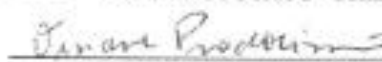
PARECER

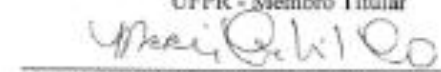
Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da Defesa de Dissertação de Mestrado, a qual se submeteu **FAELI LUGO NUNES** para fins de obter o título de Mestre em Fisiologia pela Universidade Federal do Paraná, são de parecer unânime à APROVAÇÃO da acadêmica.

A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento interno deste Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 26 de setembro de dois mil e quatorze.


Professora Doutora Percília Cardoso Glaquinto
UNESP-BOTUCATU - Membro Titular


Professora Doutora Viviane Prodocimo
UFPR - Membro Titular


Professora Doutora Marisa Fernandes de Castilho
UFPR - Orientadora e Presidente da Banca Examinadora

DEDICO

**A minha família, pelo apoio e
incentivo.**

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo amparo.

Aos meus pais, Adalberto Nunes e Eliane Lugo, pelo amor, incentivo e pela ajuda no transporte dos lambaris utilizados nesse trabalho.

À minha orientadora Marisa Fernandes de Castilho, pela paciência, compreensão e auxílio durante esse período de mestrado.

Ao Sr. João e sua esposa Iolanda, da piscicultura Peixes&Peixes, pelo fornecimento dos peixes com diferentes tamanhos, imprescindíveis para a realização dos experimentos.

À prof^a Dr^a Anete Curte Ferraz, por ter ministrado a fascinante disciplina de Neurobiologia da Memória.

Ao meu co-orientador Marcelo M. Santos Lima.

Ao meu namorado Bruno Hjort, pelo incentivo, companhia e ajuda com a alimentação dos peixes nos finais de semana.

Às colegas de mestrado, Daniele Parisotto e Angela Mara Rambo, pela companhia, amizade e apoio nos momentos difíceis. Valeu meninas!

Ao colega de mestrado Adriano Targa Dias Santos, pela atenção e ajuda quando precisei.

À CAPES pelo auxílio financeiro.

À todos que diretamente ou indiretamente contribuíram para a realização desse estudo.

Muito obrigada!

*“A alegria que se tem em pensar e aprender faz-nos pensar e
aprender ainda mais.”
(Aristóteles)*

RESUMO

O objetivo desse estudo foi testar o papel do grau hierárquico de dominância na aprendizagem e memória em lambaris (*Astyanax altiparanae*). Peixes foram pareados por quatro dias, ao longo dos quais foram identificados o dominante e submisso na dupla. Posteriormente, foram individualmente submetidos ao teste de esquiva inibitória, cujo aparato se constituiu num aquário retangular onde um estímulo aversivo (barra de ferro controlada por um sistema de roldanas) ocupava cerca de 50% da sua extensão; o estímulo era abaixado toda vez que o peixe se dirigia para esse lado (fase 1). Imediatamente após o teste, o grau hierárquico de dominância dos animais foi invertido, peixes dominantes se tornaram submissos e peixes submissos se tornaram dominantes. Os indivíduos permaneceram pareados por mais quatro dias e novamente realizaram o teste de memória aversiva (fase 2). O tempo que o animal demorou a se dirigir a área do estímulo, número de vezes que ele se dirigiu a essa área e tempo decorrido até o peixe não se dirigir mais a essa área foram registrados. Peixes dominantes que mantiveram essa posição hierárquica e aqueles que sofreram inversão do status social obtiveram o melhor desempenho, reduzindo o total de idas em direção ao estímulo aversivo e o tempo para evitá-lo quando realizaram o teste pela segunda vez. Concluímos que o status social de dominância favorece o processo de aprendizagem - animais dominantes apresentaram melhor desempenho na evocação da memória comparativamente aos submissos e esse desempenho independe da posição hierárquica assumida posteriormente, sugerindo que a submissão hierárquica não compromete a consolidação das informações aprendidas. Animais submissos, por outro lado, apresentam comprometimento da memória, com baixo desempenho no processo de aprendizagem independente do grau hierárquico assumido posteriormente a essa fase de aquisição da informação.

Palavras – chave: interação social; estresse; memória; *Astyanax altiparanae*.

ABSTRACT

The aim of this study was testing the role of dominance hierarchy in learning and memory of *Astyanax altiparanae*. Adults fishes were paired for four days, during which were identified as dominant and subordinate. Subsequently, the animals were individually submitted to the inhibitory avoidance test, which apparatus is constituted of a rectangular tank in which an aversive stimulus (iron rod controlled by a pulley system) occupied about 50% of its length; the stimulus was triggered when the fish swam towards it (phase 1). After completing the test, the dominance hierarchy was reversed, so dominant fishes became subordinate and subordinate became dominant. Subjects were paired for four days more and then performed the aversive memory tested again (phase 2). Data concerning the time for the fish to address the area of the stimulus, number of times they went to that area and time needed until they avoid this area were recorded. Dominant individuals who maintained this status as well as the dominant fish who suffered reversal of this hierarchy achieved the best performance, reducing total of visits towards the aversive stimulus and the time to avoid it when they repeated the avoidance task. We conclude that dominant animals have better performance in information acquisition (learning) compared to subordinate, dominant animals showed better performance for memory recall when compared to subordinate and that this performance is independent of the hierarchical position subsequently assumed, suggesting that the hierarchical submission doesn't compromise the consolidation of information learned. Subordinate animals, on the other hand, demonstrated impairments in associative memory, with the worst performance in the learning process and therefore in evoking this memory, independently of the hierarchical level assumed later on.

Keywords: social interaction; stress; memory; *Astyanax altiparanae*.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	9
1.2	Objetivos.....	11
1.2.1	Objetivo geral.....	11
1.2.2	Objetivos específicos.....	11
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	13
2.1	Animais e aclimatação.....	13
2.2	Delineamento experimental.....	13
2.3	Teste de aprendizagem.....	15
3.	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	17
4.	RESULTADOS.....	18
4.1	Interação agonística.....	18
4.2	Teste de aprendizagem e memória.....	19
5.	DISCUSSÃO.....	23
6.	CONCLUSÕES.....	30
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31

1. INTRODUÇÃO

Hierarquia social de dominância ocorre em muitas espécies sociais e a posição que os indivíduos ocupam dentro dessa hierarquia tem influência direta sobre a fisiologia, saúde e qualidade de vida do animal (SAPOLSKY, 2005). O estabelecimento da hierarquia social resulta da interação entre os membros de um grupo, e um animal alcança o status de dominância através de confrontos/interações agonísticas (ex. perseguição, empurrões e mordidas) com seu oponente e, em troca, recebe pouca ou nenhuma resposta agressiva, o que demonstra superior capacidade de combate (CHASE, TOVEY E MURCH, 2003; HUNTING E TURNER, 1987). A dominância social confere prioridade de acesso a alimentos, água, esconderijos e parceiros sexuais (CREEL *et al.*, 2013). Em contraste, animais submissos podem ser excluídos de tais recursos e apresentar diminuição do comportamento agressivo, redução da locomoção e alimentação, com consequente aumento da mortalidade (GILMOUR *et al.*, 2005). Em Ciclídeos, por exemplo, o crescimento e desenvolvimento dos animais está associado ao estabelecimento de uma hierarquia social de dominância, onde os animais dominantes crescem mais do que os animais submissos no grupo (VOLPATO E FERNANDES, 1994).

O ambiente social contém informações que podem induzir a resposta fisiológica ao estresse. Para animais sociais, a frequência e o tipo de interação com os co-específicos podem afetar a atividade do eixo hipotálamo- hipófise- adrenal (CREEL *et al.*, 2013) e os encontros agonísticos constituem um potente e relevante estressor social (SUMMERS, 2002). Muitos estudos têm detectado associação entre a posição ocupada na hierarquia social de dominância e os níveis de glicocorticoides, alguns relatando altos níveis em indivíduos que ocupam baixas posições no ranking social (SORENSEN *et al.*, 2011; OVERLI *et al.*, 1999; WINBERG E LEPAGE, 1998; SAPOLSKY, 1982). Durante os estágios iniciais do estabelecimento da hierarquia de dominância, a interação agonística entre os animais é mais intensa e ambos dominantes e submissos estão em situação de estresse, resultando na liberação de glicocorticoides. Contudo, quando o status social é finalmente estabelecido e mantido, diferentemente dos dominantes, os submissos geralmente continuam a exibir altas taxas de cortisol plasmático,

caracterizando um estresse crônico desses animais (FILBY *et al.*, 2010; FERNANDES-DE- CASTILHO *et al.*, 2008; SLOMAN *et al.*, 2002).

O cortisol tem sido descrito como agente inibidor da neurogênese (MCEWEN *et al.*, 1999; MIRESCU E GOULD, 2006). SORENSEN *et al.* (2011a, b) demonstrou uma associação entre níveis elevados de cortisol e diminuição da neurogênese no telencéfalo da truta arco-íris, sendo que indivíduos subordinados apresentaram redução na proliferação celular no telencéfalo, o que não ocorreu com os peixes dominantes do grupo. Tais respostas de redução da neurogênese em animais subordinados também já foram descritas para mamíferos (de roedores a primatas) na região do hipocampo (EHNINGER E KEMPERMAN, 2008).

Em peixes, assim como para mamíferos, a aprendizagem e memória permitem que os indivíduos ajustem seus comportamentos para melhor se adequarem ao ambiente ou situação na qual se encontram (EBBESSON E BRAITHWAITE, 2012). Peixes são capazes de aprender e lembrar diferentes tipos de informações (ex. localização de um recurso em relação à posição de um ponto de referência) e realizam associações simples e complexas entre diferentes estímulos (EBBESSON E BRAITHWAITE, 2012; WARBURTON, 2003). O núcleo palial lateral do telencéfalo de peixes tem sido considerado homólogo ao hipocampo de aves e mamíferos (VARGAS *et al.*, 2009) e, como tal, participa dos processos de aprendizagem e memória, especialmente a memória espacial, que compreende a forma como um organismo recolhe e processa a informação sensorial do seu entorno e registra sua orientação espacial no ambiente (CHUNG, 2008; SHORS *et al.*, 2011; BROGLIO *et al.*, 2010). O núcleo palial medial, por sua vez, é considerado homólogo a amígdala dos mamíferos, e está associado às emoções e certos tipos de aprendizado (BRAITHWAITE, 2006).

Neste estudo propomos testar o papel do status social de dominância na aquisição e evocação da memória espacial. Considerando que peixes hierarquicamente submissos apresentam níveis mais elevados de cortisol comparativamente aos animais dominantes e que altos níveis de cortisol comprometem a proliferação neuronal em diferentes áreas cerebrais, incluindo aquelas envolvidas em cognição, nossa hipótese é que peixes submissos apresentam comprometimento da aquisição e evocação da memória espacial comparativamente aos dominantes. Além disso, é sabido que a retirada dos animais dominantes promove uma reorganização social no grupo, resultando no surgimento

de um novo dominante. Assim, para esses novos dominantes (anteriormente submissos no grupo) as pressões sociais inerentes à condição de submissão deixam de existir. A questão que se segue é: qual será o impacto da redução desse estresse no desempenho cognitivo e neuronal desses animais? A mesma questão surge quando rearranjos populacionais levam os animais dominantes à condição de submissão. Assim, considerando que o telencéfalo em peixes está envolvido nos processos de aprendizagem e memória (homologo ao hipocampo em aves e mamíferos), que altas concentrações de cortisol em peixes socialmente estressados comprometem a proliferação neuronal e que manipulações dos animais podem levar a mudanças na posição hierárquicas dos indivíduos e, conseqüentemente, na concentração de cortisol, nossa proposta é investigar o desempenho cognitivo de animais dominantes e submissos e o papel da inversão da posição hierárquica de dominância nessas habilidades.

O condicionamento instrumental aversivo é um tipo de aprendizado associativo bastante utilizado na investigação dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos na formação da memória em diferentes espécies de animais, incluindo os peixes (AHMED *et al.*, 2011; CAMMAROTA *et al.*, 2000; YUE *et al.*, 2004; CARPENTER E SUMMERS, 2009; BLANK *et al.*, 2009). Neste estudo, as reações comportamentais que sinalizam a presença de perigo e permitem ao animal prevenir um estímulo aversivo foram quantificadas. A espécie escolhida para o estudo foi o lambari (*Astyanax altiparanae*, Characidae) por apresentar organização social com o estabelecimento de hierarquia de dominância, comportamento determinante para este estudo.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo do estudo foi investigar o status social de dominância no desempenho cognitivo dos peixes.

1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar a atividade cognitiva em peixes dominantes e submissos, especificamente relacionados à memória espacial e associativa aversiva.
- Investigar o impacto da inversão de posição hierárquica de dominância sobre a consolidação da memória em peixes dominantes e submissos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 ANIMAIS E ACLIMATAÇÃO

Lambaris (*Astyanax altiparanae*) foram obtidos de criadouro comercial e transferidos para o laboratório de estudos em estresse animal, da Universidade Federal do Paraná. Os peixes foram mantidos em um grupo com cerca de 100 indivíduos aclimatados às condições laboratoriais em um tanque de 100 litros com cascalho, filtro, aeração contínua e a temperatura da água 25°C. Os animais foram submetidos a um ciclo de luz de 12 h (período de luz das 07h00min às 19h00min – controlado por timer) e a alimentação foi à base de ração extrusada (37,52% de proteína), *ad libitum*, fornecida duas vezes ao dia (manhã e tarde). Os animais permaneceram nestas condições por uma semana, antes de serem utilizados no experimento.

Os procedimentos realizados no estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (certificado nº 699, 20/06/2013).

2.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O delineamento da pesquisa está esquematizado na FIGURA 1. Na fase 1, lambaris (4,5 cm \pm 1,2; 6,5 cm \pm 1,3) foram isolados por 48 horas em aquários de vidro (25cm x 20cm x 20cm – 60 litros) equipados com aeradores e aquecedores (temperatura ~24°) e revestidos com cartolina de coloração azul. Os efeitos da cor azul na prevenção do estresse foram descritos em estudos com a tilápia do Nilo *Oreochromis niloticus* (L.) (VOLPATO E BARRETO, 2001). Em seguida, os animais foram pareados por quatro dias; neste período foram identificados os dominantes e submissos em cada dupla, através de filmagens (10 min/período – manhã e tarde/dia). Pelas imagens obtidas foi quantificado o número de mordidas proferidas por cada indivíduo no oponente, o que nos permitiu inferir o rank hierárquico de cada animal/par, através da equação do “Índice de dominância” (DI = número de mordidas proferidas pelo animal/ número total de mordidas proferidas pelo par), conforme

descrito por OLIVEIRA E ALMADA (1996a) para *Oreochromis mossambicus* e GONÇALVES-DE-FREITAS *et al.* (2008) para *Oreochromis niloticus*. O animal que apresentou o maior valor de DI foi considerado o peixe dominante da dupla.

No 5º dia de pareamento, os peixes foram submetidos individualmente ao teste de memória associativa aversiva (protocolo descrito abaixo). Imediatamente após, os animais teste eram repareados com animais oriundos do tanque estoque, dando início a Fase 2 do experimento. Estudos piloto demonstraram que o paradigma de tamanho e residência prévia como fatores determinantes de dominância hierárquica (NELISSEN, 1992; BEECHING, 1992; VOLPATO E FERNANDES, 1994; BOSCOLO *et al.*, 2011) se mostrou eficiente para lambari. Assim, para a formação de novas duplas nesta fase 2, os animais teste da fase 1, DOM ou SUB, eram pareados com animais maiores ou menores do que eles. Tal procedimento possibilitou que os animais testes da fase 1 mantivessem suas posições hierárquicas (animais DOM permaneceram DOM, SUB permaneceram SUB) ou invertessem essa posição (animais DOM fase 1 tornaram-se SUB na fase 2 e animais SUB na fase 1 tornaram-se DOM na fase 2), conforme ilustrado na FIGURA 1. Após a formação das novas duplas, os animais permaneceram pareados por mais 4 dias e, no 5º dia, realizaram novamente o teste de esquiva inibitória. Os animais foram distribuídos em quatro grupos experimentais: **(G1) Grupo Controle do Grupo Social** (n= 10) - animais permaneceram isolados durante todo o período de teste; **(G2) Grupo Controle da Hierarquia Social** (n=10) - o animal confrontou-se com a sua imagem no espelho, caracterizando-se como um contexto social, mas a hierarquia de dominância não foi estabelecida; **(G3) Grupo Controle da Inversão da Hierarquia Social de Dominância** (n= 20) – não houve inversão da posição hierárquica conquistada na fase 1, animais DOM continuaram DOM e SUB permaneceram SUB durante todo o período experimental; e **(G4) Grupo Inversão da Hierarquia Social de Dominância** (n = 18) – animais DOM na fase 1 tornaram-se SUB na fase 2 e animais SUB na fase 1 tornaram-se DOM na fase 2.

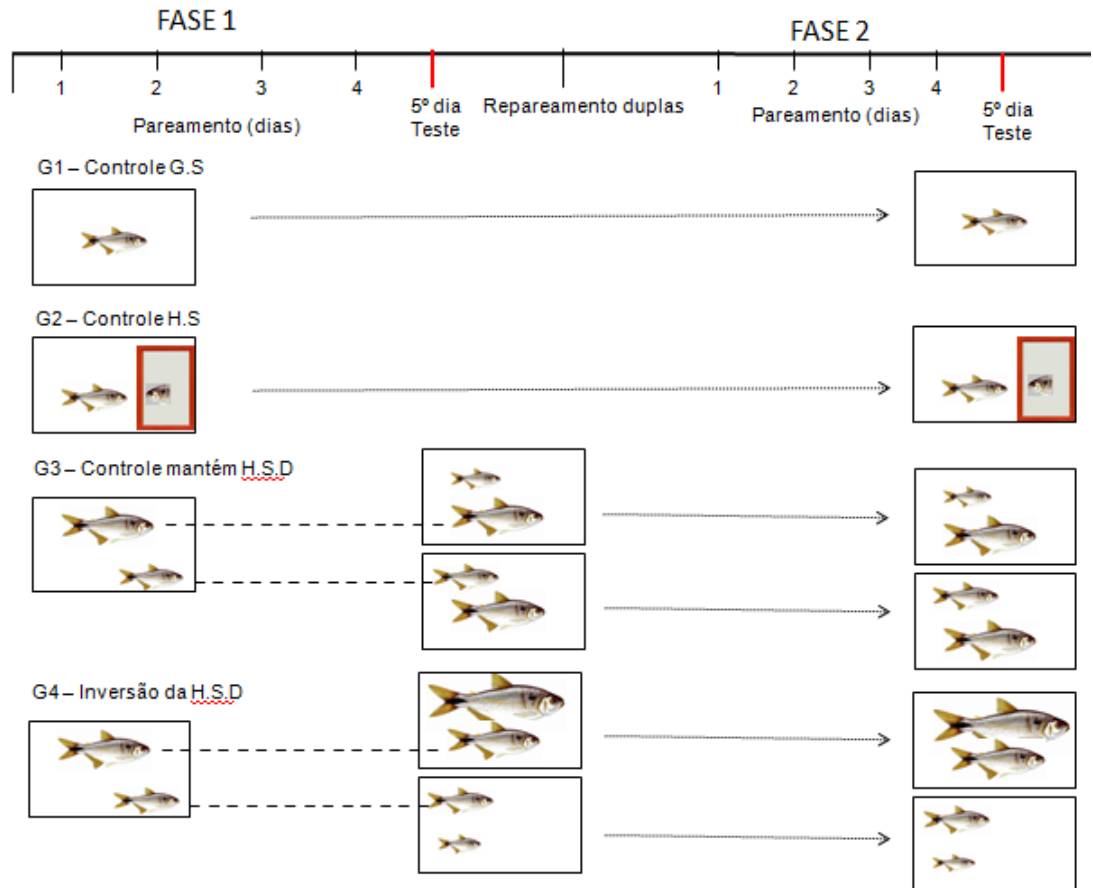


Figura 1. Protocolo experimental - nas duplas os peixes maiores representam os animais dominantes e os menores, os submissos. G1- Controle do Grupo Social; G2 – Controle da Hierarquia Social; G3 – Controle mantém a Hierarquia Social de Dominância; G4 – Inversão da Hierarquia Social de Dominância.

2.3 TESTE DE APRENDIZAGEM

Esse teste foi adaptado do teste de esquia inibitória realizado por BLANK *et al.* (2009). Neste, um estímulo aversivo foi inserido em um dos lados de um aquário de teste e era esperado que o animal reconhecesse o estímulo como aversivo e passasse a evitá-lo. O aparato consistiu de um aquário (45cm x 11cm x 15 cm – 10 litros) com 14 cm de coluna d'água (Fig. 2). Em um dos lados do aquário foi inserido um estímulo aversivo, que consistiu de uma haste de ferro arredondado medindo 19 cm de comprimento e diâmetro de 1cm, ligado a um sistema de roldanas, o qual permite que o experimentador o controle manualmente, abaixando-o até a coluna de água e levantando-o. O animal era inserido em um compartimento plástico removível situado ao meio do aquário, onde permanecia por 3 minutos para aclimação. Após

esse tempo, a barreira era removida, propiciando ao peixe livre acesso ao aquário, sendo considerado o início do teste, o qual teve duração de 10 minutos. Quando o animal se dirigia ao lado onde estava o estímulo aversivo, este era sucessivamente abaixado sobre a água causando agitação, até que o indivíduo se dirigisse ao lado oposto do aquário (lado sem estímulo). Quando isto ocorria, o peso era levantado, cessando o estímulo. Os experimentos foram filmados (Digital Vídeo Câmera JVC, 32x zoom óptico) para posterior coleta dos dados, como segue: a) tempo decorrido até o animal se dirigir ao lado do aparato contendo o estímulo aversivo – denominado latência inicial; b) número de vezes que ele se dirigiu para o lado aversivo – denominado idas ao lado aversivo e c) o tempo decorrido até o animal deixar de se dirigir ao lado do aquário no qual o estímulo aversivo se encontrava, chamado latência para escape.

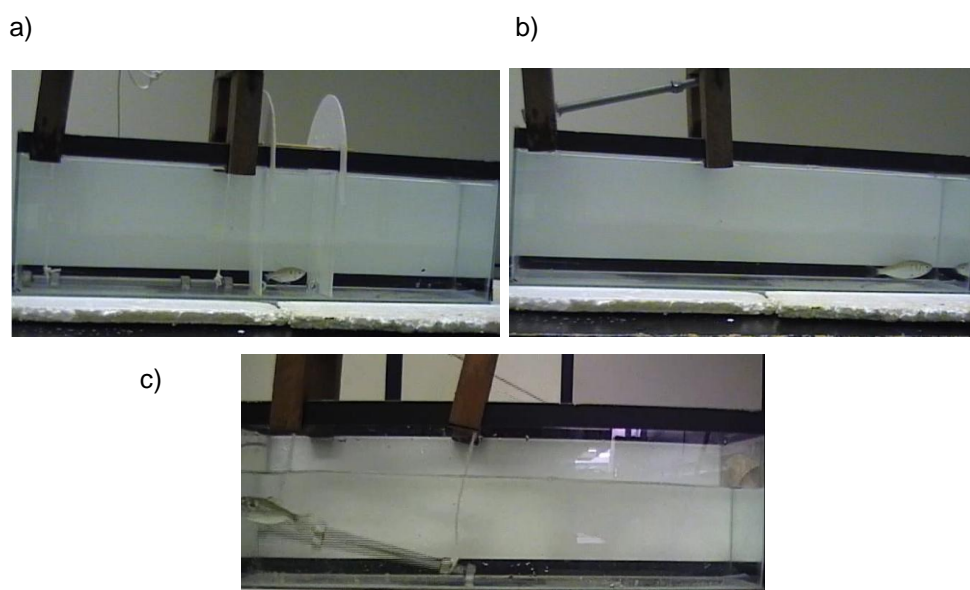


Figura 2: a) O animal foi inserido em um compartimento situado ao meio do aquário de teste para aclimação por 3 minutos. b) Quando o compartimento é removido, inicia-se o teste. Se o animal permanecer do lado contrário ao estímulo aversivo, este fica suspenso sobre o aquário. C) Quando o animal dirige-se para o lado do aparato onde há o estímulo aversivo, este é abaixado sobre a lâmina d'água.

3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os dados foram testados quanto a sua distribuição normal através do teste Kolmogorov- Smirnov. Os valores são representados como média \pm S.E.M (dados paramétricos) e mediana - percentil 25% - percentil 75% (dados não-paramétricos). Na análise do número de mordidas proferidas entre animais maiores e menores a fim de determinar os dominantes e submissos de cada dupla durante os dias de pareamento, foi utilizado o teste Two-Way ANOVA, pos-hoc Bonferroni.

Para a análise das variáveis obtidas no teste de memória associativa aversiva (latência inicial, número de tentativas e latência para escape), todos os grupos foram comparados entre si para cada variável, nas fases 1 e 2, através do teste não paramétrico Kruskal-Wallis seguido pelo teste de comparações múltiplas de Dunn. Para comparar o desempenho dos animais nas fases 1 e 2, foi utilizado o teste de wilcoxon para os grupos controle isolado e espelho e o teste de Friedman com pós teste de Dunn para o grupo controle da inversão da hierarquia social de dominância e grupo experimental inversão da hierarquia social de dominância. A proporção de animais que aprenderam o teste foi comparada entre os grupos e as fases pelo teste de Fisher. O nível de significância estatística utilizado foi de 5% ($p \leq 0,05$).

4. RESULTADOS

4.1 INTERAÇÃO AGONÍSTICA

Na equação do “índice de dominância” ($DI = \text{número de mordidas proferidas pelo animal} / \text{número total de mordidas proferidas pelo par}$) os peixes maiores de cada dupla apresentaram o maior valor de DI e foram considerados os animais dominantes.

Para a avaliação da interação agonística dos animais pareados ao longo do experimento, fases 1 e 2, o número de mordidas proferidas pelos animais nos períodos manhã e tarde foram somadas, e são apresentadas para os dias 1 a 4 de cada fase experimental. Na fase 1, animais maiores proferiram significativamente mais mordidas contra os menores, exceto no último dia de pareamento (dia 4) ($p = 0.001$; Fig. 3A). Nessa fase, a interação agonística foi maior no primeiro dia de pareamento quando comparado ao último dia ($p = 0.005$; Fig. 3A). Na fase 2, os peixes maiores também proferiram mais mordidas contra os menores ao longo dos dias ($p = 0.001$; Fig. 3B), sendo que a interação agonística dos animais foi mais intensa no primeiro dia ($p = 0.001$; Fig. 3B). Comparando-se as fases 1 e 2, observa-se que indivíduos maiores (dominantes) proferiram mais mordidas na fase 1, 1º, 2º e 3º dia de pareamento ($p = 0.0001$). Os peixes menores (submissos) da fase 1 não diferiram dos menores da fase 2, demonstrando igual padrão de interação agonística.

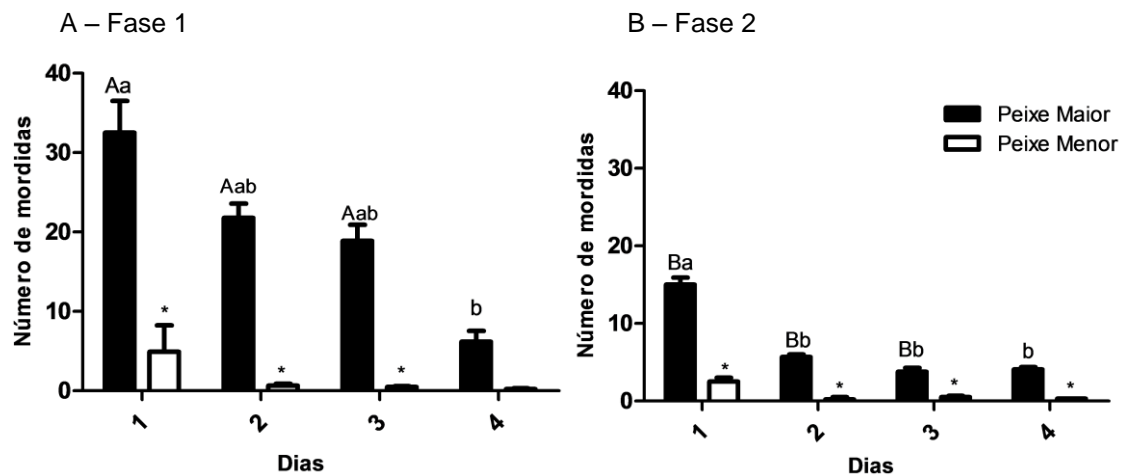


Figura 3: Mordidas proferidas pelos peixes maiores (dominantes) e menores (submissos) ao longo dos dias de pareamento, fases experimentais 1 e 2. Os dados são apresentados como média \pm S.E.M. Asterisco representa diferença entre os animais da dupla para um mesmo dia, letras em minúsculo representam diferença entre os dias para um mesmo grupo (peixes maiores ou peixes menores) e letras em maiúsculo representam diferenças entre as fases para o mesmo grupo experimental.

4.2 TESTE DE APRENDIZAGEM E MEMÓRIA

Animais mantidos em isolamento e em contexto social (espelho) não apresentaram diferença de desempenho para nenhum dos indicadores considerados em nenhuma das fases, sugerindo que não houve melhora nem piora no desempenho dos animais no teste de esquia inibitória entre as fases e que, portanto, os animais não aprenderam a evitar o estímulo aversivo (Fig. 4 G1,G2). Analisando as respostas dos peixes dominantes e submissos que ocuparam a mesma posição social nas duas fases do teste (Fig. 4 G3), observa-se que animais dominantes reduziram o número de idas ao lado aversivo e o tempo para passarem a evitar o lado do aquário contendo o estímulo aversivo na fase 2 (DD) em relação a fase 1 (D), diferentemente dos animais submissos que não apresentaram variação em nenhum desses indicadores nos dois momentos do teste (S-SS). Quando comparados dominantes e submissos em uma mesma fase, observamos que na fase 2 animais submissos (SS) apresentaram maior latência inicial para se dirigirem ao estímulo aversivo, enquanto animais dominantes (DD) apresentaram menor latência para evitar o lado contendo o estímulo aversivo. Assim, uma avaliação geral dos resultados obtidos sugere que animais dominantes tiveram melhor desempenho que submissos no teste proposto, ou seja, animais dominantes aprenderam a evitar o estímulo aversivo, mas submissos não. O desempenho dos animais dominantes e submissos que tiveram suas posições hierárquicas invertidas após o primeiro teste é

apresentado na Fig. 4 - G4. Observa-se que animais dominantes (D-DS) e submissos (S-SD) apresentaram o mesmo perfil de resposta daqueles que não tiveram seu grau hierárquico invertido (Fig 4 – G3, D-D, S-S), qual seja animais que eram dominantes na fase 1 do teste apresentaram redução significativa no número de idas ao lado do aquário onde estava o estímulo aversivo e na latência para deixar de se dirigir a esse mesmo lado na fase 2.

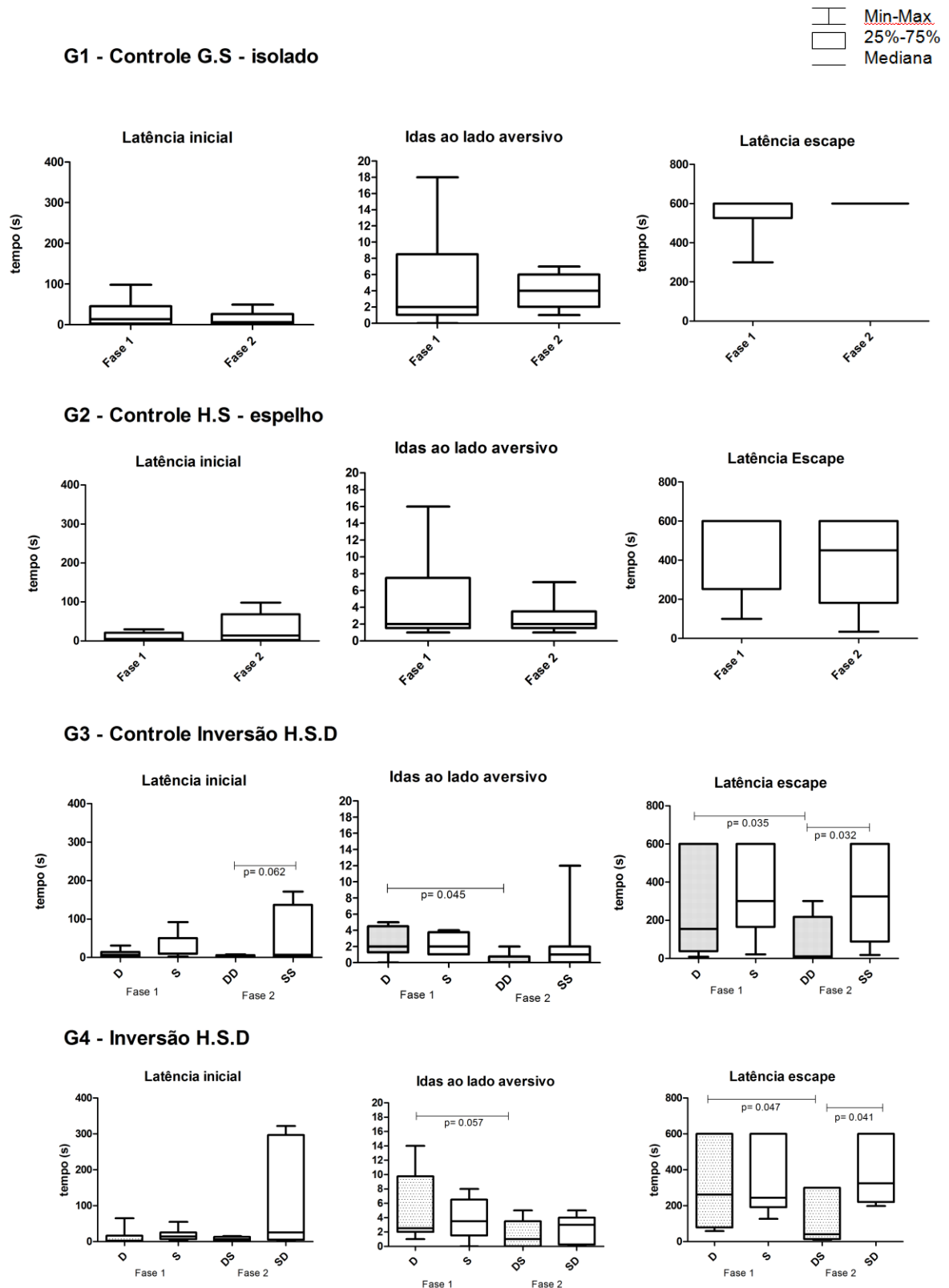


Figura 4: Latência inicial – tempo decorrido até o animal se dirigir ao lado contendo o estímulo aversivo. Latência para escape - tempo necessário para o peixe evitar o lado do aquário contendo o estímulo aversivo. Idas ao lado aversivo - número de vezes que o animal se dirigiu ao estímulo aversivo. DD – dominante fase 1 que mantém a dominância na fase 2; SS – submisso fase 1 que mantém essa posição hierárquica na fase 2; DS – dominante fase 1 que se torna submisso na fase 2; SD – submisso fase 1 que se torna dominante na fase 2. Os dados são apresentados como mediana e intervalo interquartil 25%-75% ($p \leq 0.05$).

A porcentagem de animais que aprenderam a evitar o estímulo aversivo (latência para escape) foi avaliada segundo uma linha de corte – aqueles que demoravam até 200 segundos para evitar o estímulo aversivo (1/3 do tempo total de exposição – 600 segundos) foram considerados como tendo aprendido a tarefa (Tabela 1).

Tabela 1: Porcentagem de indivíduos que aprenderam o teste nas fases 1 e 2.

Grupos	0 – 200 (s) (% de indivíduos)	
	Fase 1	Fase 2
DS (G4)	43 ^{Ace}	72 ^{Bc}
SD (G4)	35 ^{Aed}	19 ^{Bd}
DD (G3)	55 ^{Ac}	73 ^{Bc}
SS (G3)	23 ^{Ad}	44 ^{Be}
Espelho (G2)	10 ^{Ab}	40 ^{Bb}
Isolado (G1)	0 ^a	0 ^a

Letras em minúsculo representam diferenças entre os grupos para a mesma fase e as letras e maiúsculo representam diferenças no mesmo grupo entre diferentes fases. DS- Animais dominantes na fase 1 que se tornaram submissos na fase 2; SD – Animais submissos na fase 1 que se tornaram dominantes na fase 2; DD – Animais dominantes que mantiveram essa posição hierárquica nas fases 1 e 2; SS- Animais submissos que mantiveram essa posição hierárquica nas duas fases do experimento.

De acordo com o teste de Fisher, os animais isolados não aprenderam o teste, diferindo de todos os demais grupos nas fases 1 e 2: D-G4 ($p=0.0001$), S-G4 ($p=0.0001$), D-G3 ($p=0.0001$), S-G3 ($p<0.0001$) e espelho- G2 ($p=0.0097$). Os indivíduos do G2- espelho também diferiram dos demais grupos nas duas fases, com menor porcentagens de animais que aprenderam o teste: D-G4 ($p=0.0001$); S-G4 ($p=0.0001$); D-G3 ($p=0.0001$) e S-G3 apenas na fase 1 ($p=0.0327$); porém apresentaram melhora no desempenho da fase 1 para 2 ($p=0.0001$)

Os peixes dominantes apresentaram as maiores porcentagens de indivíduos que aprenderam o teste, tanto na fase 1 quanto na fase 2; além disso, houve um aumento significativo desses animais na fase 2 ($p= 0.0120$), independentemente para posição social assumida nesta fase (permanecer dominante ou passar a ser submisso). Os animais submissos, por outro lado, apresentaram diferenças significativas em relação à posição social assumida na 2ª fase do teste: houve um aumento significativo ($p=0.0026$) no número de animais que aprenderam quando estes permaneceram submissos e uma redução significativa ($p=0.0164$) quando estes se tornaram dominantes.

5. DISCUSSÃO

Nesse estudo testamos o papel do status social de dominância na aprendizagem e memória de lambaris (*Astyanax altiparanae*). Utilizando um teste de aprendizagem associativa aversiva era esperado que os indivíduos associassem uma resposta, um ato motor, a prevenção de um estímulo aversivo, ou seja, aprender que um determinado comportamento está associado a uma determinada consequência (BEAR *et al.*, 2008). No caso do teste proposto, os animais deveriam associar que nadar em direção a determinado lado do aquário acarreta em aparecimento de um estímulo aversivo e como resposta, o animal deveria fugir/evitar esse estímulo.

Para avaliar o desempenho dos peixes no teste, quatro parâmetros foram mensurados: latência inicial, idas ao lado aversivo, latência para escape e porcentagem de animais que aprenderam de acordo com o tempo decorrido para escape. Assim, consideramos que um determinado grupo experimental aprendeu a tarefa quando houve alta latência inicial para se dirigir ao estímulo aversivo, redução no número de idas ao lado do aquário onde estava o estímulo aversivo, redução de tempo decorrido desde o início do teste para que o animal deixasse de se dirigir ao lado do aquário contendo o estímulo aversivo e alta porcentagem de animais que deixaram de ir em direção ao estímulo aversivo no terço inicial de tempo do teste (tempo total do teste = 600 minutos).

O teste de aprendizagem utilizado nesse trabalho seguiu um protocolo diferente dos demais estudos que também avaliaram o condicionamento de medo em peixes (YUE *et al.*, 2004; CARPENTER E SUMMERS, 2009; BLANK *et al.*, 2009; MILLOT *et al.*, 2014). Em nosso protocolo, os animais não tiveram sessões de treino e não foi permitido a eles explorar o aparato antes da realização do teste. Como os animais foram avaliados em relação ao estresse social, várias sessões de treinos com sucessivas manipulações poderiam acarretar em estresse adicional àquele já induzido pelo contexto experimental.

A escolha do estímulo aversivo usado no teste (peso suspendido por um sistema de roldanas) baseia-se no fato já descrito de que estímulos súbitos e intensos causam medo em mamíferos e aves (GRAY, 1971 apud YUE *et al.*, 2004) e, possivelmente, em peixes. Esses trabalhos que avaliaram o condicionamento de

medo em peixes utilizaram diferentes tipos de estímulos aversivos para induzir respostas fisiológicas e comportamentais, como exemplo, presença de um peixe agressor de maior tamanho (CARPENTER E SUMMERS, 2009), uma rede que era abaixada sobre a água do aquário de teste (YUE *et al.*, 2004; MILLOT *et al.*, 2014) e choque elétrico (BLANK *et al.*, 2009).

Como este estudo não tinha como objetivo testar a associação entre estímulo aversivo-não aversivo, não havia no aquário nenhuma informação à qual o animal pudesse fazer essa associação. Considerando que houve melhora significativa de alguns grupos experimentais, e especialmente na porcentagem de animais que responderam rapidamente ao estímulo aversivo, evitando-o, avaliamos que o aparato aqui utilizado se mostrou eficiente para o teste aqui proposto.

Observamos que animais submissos na hierarquia social de dominância apresentaram maior tempo de latência para se dirigir ao estímulo aversivo em comparação aos dominantes na fase 2. Após a inversão da hierarquia social de dominância, os peixes submissos que se tornaram dominantes demonstraram comprometimento desse desempenho. Assim, a manipulação hierárquica com consequente inversão da posição social ocupada por esses indivíduos na fase 1, modificou o padrão de resposta dos peixes submissos quando estes se tornaram dominantes (fase 2), com aumento da média de tempo decorrido para se dirigir ao estímulo aversivo e aumento na variabilidade dos dados. O aumento na latência para se dirigir ao estímulo aversivo poder ser um indicativo de que o animal é capaz de formar representações mentais de eventos ainda não presentes em seu ambiente e então tomar a decisão de como agir (YUE *et al.*, 2004).

No total de idas ao lado aversivo era esperado que os animais reduzissem o número de idas ao lado que continha o estímulo aversivo (BEAR *et al.*, 2008). Animais inseridos em um contexto social e estabelecidos como dominantes apresentaram redução no número de idas ao lado aversivo quando realizaram o teste na fase 2 em comparação a seu desempenho na fase 1. A inversão da hierarquia social de dominância não resultou em comprometimento desse desempenho para os animais dominantes que se tornaram submissos, pois estes continuaram a demonstrar o mesmo padrão de resposta que os animais dominantes que não sofreram inversão dessa posição hierárquica. Os peixes submissos que mantiveram essa posição social não apresentaram melhora no desempenho quando repetiram o teste na fase 2 e nem quando estes indivíduos se tornarem dominantes.

Para esse parâmetro, o contexto social por si só não promoveu melhora no desempenho, mas sim a ocupação do status de dominante na fase 1, visto que a inversão da posição hierárquica desses animais na fase seguinte (animais dominantes tornaram-se a submissos) não comprometeu o desempenho dos animais.

Na latência para escape era esperado que os indivíduos reduzissem o tempo para evitar, deixar de se dirigir, ao lado do aquário contendo o estímulo aversivo. Apenas estar inserido em um contexto social não interferiu significativamente no desempenho dos animais, mas sim ocupar a posição de dominância. Após a inversão da hierarquia social, os peixes dominantes que se tornaram submissos continuaram a exibir a mesma resposta dos indivíduos dominantes que não sofreram essa inversão da posição hierárquica. Já os animais submissos não apresentaram melhora no desempenho em nenhuma circunstância. Assim, ocupar a posição de dominância na fase de aquisição das informações parece ser um fator que favorece a aprendizagem.

Uma das hipóteses desse estudo era que quando houvesse inversão da hierarquia social de dominância e peixes submissos se tornassem dominantes, as pressões sociais inerentes à condição de submissão deixariam de existir, com consequente diminuição do estresse inerente a condição. Considerando que níveis aumentados de cortisol podem acarretar em prejuízos nos processos cognitivos (aprendizagem e memória) (SCHWABE *et al.*, 2012; GAIKWAD *et al.*, 2011; SOUSA *et al.*, 2008; KIM E DIAMOND, 2002), e que em peixes ocorre proliferação celular e diferenciação neural durante toda a vida do animal (CHAPOUTON *et al.*, 2007; ZUPANC, 2008; ZUPANC E SÎRBULESCU, 2011) a ascensão na hierarquia social, ou seja, um animal passando de submisso a dominante levaria, segundo a nossa hipótese, há um “crescimento compensatório” de áreas e conexões nervosas, com consequente melhora no desenvolvimento cognitivo desses indivíduos.

Da mesma forma, peixes dominantes que sofrem inversão dessa hierarquia e se tornam submissos passariam a lidar com as pressões impostas por essa posição no ranking social (estresse gerado pela presença do dominante), o que acarretaria um prejuízo cognitivo. Contudo, observamos que os animais dominantes que sofreram inversão da hierarquia social e se tornaram submissos apresentaram desempenho similar aos indivíduos dominantes que mantiveram essa posição hierárquica. Isso indica que ser o dominante na fase de aquisição das informações

(exposição ao teste), foi um fator determinante para o melhor desempenho desses animais.

Animais dominantes demonstraram habilidade para formação da memória de longa duração, uma vez que após aprender o teste (fase 1), os lambaris foram capazes de recordar e evocar essa informação, melhorando significativamente seu desempenho após 5 dias. Outros estudos também demonstraram a habilidade de peixes na retenção e evocação da memória; *Sparus aurata* foram capazes de memorizar um estímulo aversivo por um período de 3 dias e um estímulo apetitivo – recompensa por 5 dias (MILLOT *et al.*, 2014); trutas (*Oncorhynchus mykiss*) apresentaram retenção da memória por um período de no mínimo 7 dias (YUE *et al.*, 2004) e zebrafish (*Danio rerio*) foram capazes de memorizar uma tarefa de habilidade espacial por um período de 10 dias (WILLIAMS *et al.*, 2002).

Os animais submissos que sofreram inversão da hierarquia social e se tornaram dominantes não apresentaram melhora em nenhum dos parâmetros, ao contrário, houve uma redução na porcentagem de animais deste grupo que aprenderam a evitar o estímulo entre as fases 1 e 2 e também quando comparados aos animais submissos que mantiveram a posição hierárquica. Como o mesmo não ocorreu para os submissos e mantiveram sua posição social na fase 2 e nem para os dominantes que posteriormente se tornaram submissos, nossos achados sugerem que ter passado a ocupar a posição de dominância posteriormente ao teste (fase 1) foi o que promoveu um efeito deletério ao processo de consolidação da memória. É possível que para esses animais o estresse decorrente dos confrontos e manutenção da dominância imposto a animais já debilitados pela submissão na fase 1 tenham se somado e comprometido o desempenho dos animais.

O pior desempenho dos animais submissos em comparação aos dominantes deve estar associado à ação dos glicocorticoides modulando os processos de aprendizagem e memória. As agressões recebidas pelos animais submissos antes da realização do teste na fase 1 podem ter desencadeado um quadro de estresse crônico nesses animais, o que compromete a aquisição da nova informação aprendida e a formação da memória com consequente prejuízo do desempenho na fase 2. De fato, SORENSEN *et al.*, (2011) encontraram que após o pareamento de dominantes e submissos por um período de 4 dias, peixes submissos de truta arco – íris (*Oncorhynchus mykiss*) apresentaram redução de 40% na proliferação de células do telencéfalo comparados com animais controle isolados, e essas

mudanças foram acompanhadas por indicadores fisiológicos e comportamentais de estresse crônico (elevados níveis de cortisol plasmático, redução da alimentação e aumento da atividade serotoninérgica 5-HT e 5-HIAA no encéfalo). Ainda segundo esses mesmos autores, peixes dominantes não demonstraram redução na proliferação celular no telencéfalo, e a proliferação celular nos peixes submissos estava correlacionada negativamente com a agressão recebida imediatamente após a formação da hierarquia, indicando que o nível da supressão da divisão celular está relacionado com a severidade do estressor social.

Em mamíferos, a neurogênese em adultos dominantes e submissos tem sido relacionada com a variedade de experiências vivenciadas por ambos os indivíduos. Animais dominantes em geral apresentam comportamento mais agressivo e passam mais tempo interagindo com as fêmeas para o acasalamento (BLANCHARD *et al.*, 2001) e ambos os comportamentos estão relacionados com o aumento nos níveis de testosterona (ALBERT *et al.*, 1992). Há relação positiva entre o aumento nos níveis de testosterona e a neurogênese em regiões do prosencéfalo de adultos (FOWLER *et al.*, 2003), o que talvez possa influenciar no desempenho cognitivo desses animais.

É bem conhecido que hormônios glucocorticóides secretados pelo córtex da adrenal após um evento estressante influencia a performance cognitiva. O estresse pode afetar a memória de várias maneiras, e dependendo da duração e do momento em que o indivíduo foi exposto a uma situação estressante, pode haver prejuízos ou facilitação dos processos de memória (MCEWEN E SAPOLSKY, 1995; MAGARINOS *et al.*, 1996; QUERVAIN *et al.*, 1998; ROOZENDAAL, 2002; SCHWABE *et al.*, 2012).

Tem sido proposto que há dois tipos de receptores para os glicocorticóides (tipo I conhecido como receptor mineralocorticoide; tipo II chamado receptor de glicocorticoide) presentes no hipocampo de mamíferos. Os glicocorticóides tem alta afinidade pelos receptores do tipo I que são ocupados por níveis basais de esteróides da adrenal. Contudo, quando há elevação dos níveis desses hormônios em uma situação de estresse crônico, por exemplo, os receptores do tipo II também são ocupados. A seletiva ocupação dos receptores tipo I no hipocampo aumenta os processos de LTP (potencialização de longa duração), enquanto que a ocupação dos receptores tipo II por altos níveis de glicocorticóides endógenos suprime o mecanismo de LTP (MCEWEN E SAPOLSKY, 1995; SOUSA *et al.*, 2008).

Estudos mais recentes têm proposto que as catecolaminas e os glicocorticoides interagem com a amígdala basolateral para induzir um “modo de formação da memória” que permite ao organismo codificar de forma eficaz as experiências vividas sobre estresse. A consolidação dessas experiências na memória de longo prazo é promovida por um “modo de armazenamento de memória”, que é iniciada por ações genômicas dos glicocorticoides em algum momento após a experiência de estresse ter acabado (SCHWABE *et al.*, 2012). Processos de evocação da memória são usualmente prejudicados com altos níveis de glicocorticoides no hipocampo (ROOZENDAAL, 2002).

Os peixes do grupo controle isolado apresentaram o pior desempenho no teste de aprendizagem o que indica déficits cognitivos. É conhecido que para animais sociais a condição de isolamento é muito estressante. O isolamento social pode exacerbar as consequências negativas do estresse e aumentar o risco para o desenvolvimento de psicopatologias (STRANAHAN *et al.*, 2006).

Animais sociais que são privados de interações apresentam redução na proliferação de neurônios com consequente prejuízo nos processos de aprendizagem e memória (HAN *et al.*, 2011). Estudos com truta arco íris (*Oncorhynchus mykiss*) demonstraram que 6 dias de isolamento desencadeou estresse crônico nos indivíduos (OVERLI *et al.*, 2002) e 6 dias de tratamento oral com cortisol (administrado na ração) levou a supressão da proliferação celular no telencéfalo de peixes (SORENSEN *et al.*, 2011) o qual pode ter efeito negativo na aprendizagem e retenção da memória. Além disso, animais que estão submetidos a uma situação de estresse por longo período de tempo sofrem mudanças neurobiológicas, como inibição da neurogênese, atrofia de dendritos e prejuízos na plasticidade sináptica hipocampal (KOZOROVITSKIY E GOULD, 2004; MAGARINOS *et al.*, 1996).

Para mamíferos, foi descrito que breves períodos de estresse podem potencializar a formação da memória, mas em contraste, estressores mais severos ou prolongados podem exercer efeitos deletérios sobre a cognição e estes podem ser atribuídos a mudanças reversíveis na morfologia de neurônios hipocampais (MCEWEN E SAPOLSKY, 1995).

Para a espécie estudada, o isolamento social comprometeu mais o desempenho no teste que a condição de submissão, mesmo com o estresse imposto pela formação e manutenção da hierarquia social de dominância, uma vez

que os peixes submissos sofreram agressões diretas advindas dos animais dominantes durante o período de pareamento.

Os resultados indicam que estar em um contexto social, independente da definição da hierarquia, foi menos prejudicial ao aprendizado da tarefa proposta do que o isolamento. O uso de espelhos para reduzir o estresse ocasionado pelo isolamento social pode ser uma alternativa para a espécie *Astyanax altiparanae*. A utilização de espelhos para minimizar os efeitos do estresse causado pelo isolamento social tem sido uma estratégia adotada em diferentes espécies de animais, como ex. pássaros (HENRY *et al.*, 2008), peixes (PETRAZZINI *et al.*, 2012), cavalos (KAY E HALL, 2009) e novilhas (PILLER *et al.*, 1999), uma vez que podem proporcionar algum tipo de estimulação social.

Assim, os dados obtidos neste estudo indicam que animais dominantes tiveram melhor desempenho no teste proposto comparativamente aos submissos, que a consolidação da informação adquirida pelos dominantes foi mantida independentemente do grau hierárquico assumido posteriormente pelo dominante, ou seja, dominância ou submissão. O status social de submissão, por outro lado, leva ao comprometimento da aprendizagem que pode ser exacerbada quando esses animais passam a assumir a posição de dominância.

6. CONCLUSÃO

Concluimos que a falta de estimulação social pode prejudicar a aprendizagem em peixes. Em um grupo social, animais dominantes tem mais sucesso na aquisição de informações espaciais comparativamente a submissos e essa aprendizagem não é comprometida quando esses animais perdem a dominância logo após a experiência. Animais submissos, por outro lado, apresentam comprometimento da aprendizagem, a qual é ainda mais exacerbada quando esses animais se tornam dominantes imediatamente após a exposição ao estímulo aversivo. Assim, os dados obtidos corroboram a hipótese de que animais submissos apresentam comprometimento da memória, seja aquisição, seja evocação da mesma.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMED, O; SEGUIN, D; GERLAI, R. An automated predator avoidance task in zebrafish. **Behavioural Brain Research**, v.216, p. 166-171, 2011.
- ALBERT, D.J; JONIK, R.H; WALSH, M.L. Hormone-dependent aggression in male and female rats: experiential, hormonal, and neural foundations. **Neuroscience & Biobehavioral**, v.16, p. 177-192, 1992.
- BEAR, F. M; CONNORS, W.B; PARADISO, A.M; Neurociências. Desvendando o sistema nervoso. In: QUILLFELDT, A. J. Porto Alegre: **Artmed** 3ª Ed, p.764765, 2008.
- BEECHING, S.C. Visual assessment of body size in a cichlid fish, the Oscar, *Astronotus ocellatus*. **Ethology**, v. 90, p.177–186, 1992.
- BLANCHARD, R.J; DULLOOG, L; MARKHAM, C; NISHIMURA, O; NIKULINA, C. J; JUN, A; HAN, C; BLANCHARD, D.C. Sexual and aggressive interactions in a visible burrow system with provisioned burrows. **Physiology & Behavior**, v.72, p. 245-254, 2001.
- BLANK, M; GUERIM, L. D; CORDEIRO, R. F; VIANNA, M. R. M. A one-trial inhibitory avoidance task to zebrafish: Rapid acquisition of an NMDA-dependent long-term memory. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 92, 529–534, 2009.
- BOSCOLO, P. N. C; MORAIS, N. R; ALVES-de-FREITAS, G. E. Same-sized fish groups increase aggressive interaction of sex-reversed males Nile tilapia GIFT strain. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 135, p.154-159, 2011.
- BRAITHWAITE, V. A. Cognitive ability in fish. In: **Behaviour and Physiology of Fish** (eds SLOMAN, K. A.; WILSON, R. W.; BALSHINE, S.), Fish Physiology, v. 24, p. 1-37, 2006.
- BROGLIO, C; RODRÍGUEZ, F; GÓMEZ, A; ARIAS, J.L; SALAS, C. Selective involvement of the goldfish lateral pallium in spatial memory. **Behavioural Brain Research**, v. 210, p. 191-201, 2010.
- CAMMAROTA, M; BEVILAQUA, M.R.L; ARDENGHI, P; PARATCHA, G; LEVI-DE-STEIN, M; IZQUIERDO, I; MEDINA, H.J. Learning-associated activation of nuclear MAPK, CREB and Elk-1, along with Fos production, in the rat hippocampus after a one-trial avoidance learning: abolition by NMDA receptor blockade. **Molecular Brain Research**, v.76, p.36-46, 2000.
- CARPENTER, E. R; SUMMERS, H. C. Learning strategies during fear conditioning. **Neurobiology of Learning and Memory**, v.91, p. 415-423, 2009.
- CHAPOUTON, P; JAGASIA, R; BALLY- CUIF, L. Adult neurogenesis in non-mammalian vertebrates. **Bioessays**, v. 29, p. 745-757, 2007.

CHASE, I. D; TOVEY, C; MURCH, P. Two's company, three's a crowd: Differences in dominance relationships in isolated versus socially embedded pairs of fish. **Behaviour** v.140, p. 1193-1217, 2003.

CHUNG, S. Appropriate maze methodology to study learning in fish. **Journal of Undergraduate Life Sciences**, v. 2, n. 1, p. 52-55, 2008.

CREEL, S; DANTZER, B; GOYMANN, W; RUBENSTEIN, D.R. The ecology of stress: effects of the social environment. **Functional Ecology**, v.27, p.66-80, 2013.

EBBESSON, E. O. L; BRAITHWAITE, A. V. Environmental effects on fish neural plasticity and cognition. **Journal of fish biology**, v.81, p. 2151-2174, 2012.

EHNINGER, D.; KEMPERMAN, G. Neurogenesis in the adult hippocampus. **Cell and Tissue Research**, v. 331, p. 243-250, 2008.

FERNANDES-DE-CASTILHO, F.; POTTINGER, T. G.; VOLPATO, G. L. Chronic social stress in rainbow trout: Does it promote physiological habituation? **General and Comparative Endocrinology**, v. 155, p. 141-147, 2008.

FILBY, A. L; PAULL, G.C; BARTLETT, E.J; VAN LOOK, K.J; TYLER, C.R. Physiological and health consequences of social status in zebrafish (*Danio rerio*). **Physiology & Behavior**, v. 101, p. 576–587, 2010.

FOWLER, C.D; FREEMAN, M.E; WANG, Z. Newly proliferated cells in the adult male amygdala are affected by gonadal steroid hormones. **Journal of Neurobiology**, v. 57, p. 257-269, 2003.

GAIKWAD, S; STEWART, A; HART, P; WONG, K; PIET, V; CACHAT, J; KALUEFF, V. A; Acute stress disrupts performance of zebrafish in the cued and spatial memory tests: The utility of fish models to study stress-memory interplay. **Behavioural Processes**, v. 87, p. 224-230, 2011.

GILMOUR, K; DIBATTISTA, J; THOMAS, B.J. Physiological causes and consequences of social status in salmonid fish. **Integrative and Comparative Biology**, v.45, p. 263-273, 2005.

GONCALVES-DE-FREITAS, E; TERESA, F.B; GOMES, F.S; GIAQUINTO, P.C. Effect of water renewal on dominance hierarchy of juvenile Nile tilapia. **Applied Animal Behaviour Science**, v.112, p. 187–195, 2008.

GRAY, J. The psychology of fear and stress. **Weindenfeld and Nicolson**, 1971.

HAN, X; WANG, W; XUE, X; SHAO, F; LI, N. Brief social isolation in early adolescence affects reversal learning and forebrain BDNF expression in adult rats. **Brain Research Bulletin**, v. 86, p. 173-178, 2011.

HENRY, L; LE CARS, K; MATHELIER, M; BRUDERER, C; HAUSBERGER, M. The use of a mirror as a 'social substitute' in laboratory birds. **ScienceDirect**, v.331, p.526-531, 2008.

HUNTINGFORD, F.A; TURNER, A.K. Animal Conflict. **Chapman and Hall**, 1987.

KAY, R; HALL, C. The use of a mirror reduces isolation stress in horses being transported by trailer. **Applied Animal Behaviour Science**, v.116, p. 237-243, 2009.

KIM, J.J; DIAMOND, M.D. The stressed hippocampus, synaptic plasticity and lost memories. **Nature**, v.3, p.453-462, 2002.

KOZOROVITSKIY, E; GOULD, J. J. Dominance hierarchy influences adult neurogenesis in the dentate gyrus. **Neuroscience**, v. 24, p. 6755- 6759, 2004.

MAGARINOS, A. M ; MCEWEN, S.B ; FLUGGE, G ; FUCHS,E. Chronic psychosocial stress causes apical dendritic atrophy of hippocampal CA3 pyramidal neurons in subordinate tree shrews. **The Journal of Neuroscience**, v16, p. 3534- 3540, 1996.

MCEWEN, S. B; SAPOLSKY, M.R. Stress and cognitive function.**Current Opinion in Neurobiology**, v. 5, p. 205-216, 1995.

MCEWEN, S. B; TANAPAT, P; WEILAND, G.N. Inhibition of dendritic spine induction on hippocampal CA1 pyramidal neurons by a nonsteroidal estrogen antagonist in female rats. **Endocrinology**, v.140, p.1044-1047, 1999.

MILLOT, S; CERQUEIRA, M; CASTANHEIRA, F, M; OVERLI, O; MARTINS, M. I. C; OLIVEIRA, F. R. Use of conditioned place preference/avoidance tests to assess affective states in fish. **Applied Animal Behaviour Science**, v.154, p.104-111, 2014.

MIRESCU, C; GOULD, E. Stress and adult neurogenesis. **Hippocampus**, v.16, p. 233-238, 2006.

NELISSEN, M.H.J. Does body size affect the ranking of a cichlid fish in a dominance hierarchy? **Journal of Ethology**, v.10, p.153–156, 1992.

OLIVEIRA, R.F; ALMADA, V.C. On the (in)stability of dominance hierarchies in the cichlid fish *Oreochromis mossambicus*. **Aggressive Behavior**, v.22, p. 37–45, 1996a.

OVERLI, O; OLSEN, E. R; LOVIK, F; RINGO, E. Dominance hierarchies in Arctic charr, *Salvelinus alpinus* L.: differential cortisol profiles of dominant and subordinate individuals after handling stress. **Aquaculture Research**, v. 30, p. 259-264, 1999.

OVERLI, O; POTTINGER, T.G; CARRICK, T.R; OVERLI, E; WINBERG, S. Differences in behavior between rainbow trout selected for high- and low – stress responsiveness. **Journal of Experimental Biology**, v.205, p. 391-395, 2002.

PETRAZZINI, M. E. M; AGRILLO, C; PIFFER, L; DADDA, M; BISAZZA, A. Development and application of a new method to investigate cognition in newborn guppies. **Behavioural Brain Research**, v.233, p. 443-449, 2012.

PILLER, K.A.C; STOOKEY, M.J; WATTS, M.J. Effects of mirror-image exposure on heart rate and movement of isolated heifers. **Applied Animal Behaviour Science**, v.63, p.93-102, 1999.

QUERVAIN, F. J. D; ROOZENDAAL, B; MCGAUGH, L.J. Stress and glucocorticoids impair retrieval of long-term spatial memory. **Nature**, v. 394, 1998.

ROOZENDAAL, B. Stress and memory: opposing effects of glucocorticoids on memory consolidation and memory retrieval. **Neurobiology of Learning and Memory**, v.78, p.578-595, 2002.

SAPOLSKY, R. The endocrine stress-response and social status in the wild baboon. **Hormones and Behavior**, v. 15, p.279-285, 1982.

SAPOLSKY, R. M. The Influence of Social Hierarchy on Primate Health. **Science**, v. 308, p. 648-652 ,2005.

SCHWABE, L; JOËLS, M; ROOZENDAAL, B; WOLF, T. O; OITZL, S.M; Stress effects on memory: An update and integration. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 36, p. 1740-1749, 2012.

SHORS, T. J; ANDERSON, M.L; CURLIK, D.M 2nd; NOKIA, M.S. Use it or lose it: How neurogenesis keeps the brain fit for learning. **Behavioural Brain Research**, 2011.

SLOMAN, K. A.; MONTPETIT, C. J.; GILMOURA, K. M. Modulation of catecholamine release and cortisol secretion by social interactions in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **General and Comparative Endocrinology**, v. 127, p. 136–146, 2002.

SORENSEN, C; BOHLIN, L.C; OVERLI, O; NILSSON, G.E. Cortisol reduces cell proliferation in the telencephalon of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Physiology & Behavior**, v. 102. p. 518-523, 2011a.

SORENSEN, C; NILSSON, G.E; SUMMERS, C.H; OVERLI, O. Social stress reduces forebrain cell proliferation in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Behavioural Brain Research**, 2011b.

STRANAHAN, M. A; KHALIL, D; GOULD, E. Social isolation delays the positive effects of running on adult neurogenesis. **Nature Neuroscience**, v.9, p.4, 2006.

SOUSA, N; CERQUEIRA, J. J; ALMEIDA, X.F.O; Corticosteroid receptors and neuroplasticity, **Brain Research Reviews**, v.57, p. 561-570, 2008.

SUMMERS, C.H. Social interaction over time, implications for stress responsiveness. **Integrative and Comparative Biology**, v.42, p. 591-599, 2002.

VARGAS, J. P.; LOPEZ, J. C.; PORTAVELLA, M. What are the functions of fish brain pallium? **Brain Research Bulletin**, v. 79, p. 436-440, 2009.

VOLPATO, G. L.; FERNANDES, M. Social control of growth in fish. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**., v. 27, p. 797-810, 1994.

VOLPATO, G. L; BARRETO, R. E. Environmental blue light prevents stress in the fish Nile tilapia. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 34(8), p. 1041-1045 (Short Communication), 2001.

ZUPANC, G.K.H. Adult neurogenesis and neuronal regeneration in the brain of teleost fish. **Journal of Physiology – Paris**, v. 102, p. 357-373, 2008.

ZUPANC, G.K.H; ȘÎRBULESCU, R.F. Adult neurogenesis and neuronal regeneration in the central nervous system of teleost fish. **European Journal of Neuroscience**, v34, p. 917-929, 2011.

WARBURTON, K. Learning of foraging skills by fish. **Fish and Fisheries**, v. 4, p. 203-215, 2003.

WILLIAMS, F.E; WHITE, D; MESSER, W.S. A simple spatial alternation task for assessing memory function in zebrafish. **Behavioural Processes**, v.58, p. 125-132, 2002.

WINBERG, S; LEPAGE, O. Elevation of brain 5-HT activity, POMC expression, and plasma cortisol in socially subordinate rainbow trout. **American Journal of Physiology**., v. 274, p. 645-654, 1998.

YUE, S; MOCCIA, R. D; DUNCAN, H.J.I. Investigating fear in domestic rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, using an avoidance learning task. **Applied Animal Behavioural Science**, v. 87, p. 343-354, 2004.